

A komplement MASP-1 szerepe az endotélsejtek gyulladásos aktivációjában

Doktori tézisek

Jani Péter Károly

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető:	Dr. Cervenak László, tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Hivatalos bírálók:	Dr. Holub Marianna Csilla, egyetemi adjunktus, Ph.D. Dr. Veszeka Szilvia, tudományos munkatárs, Ph.D.
Szigorlati bizottság elnöke:	Dr. Buzás Edit, egyetemi tanár, DSc.
Szigorlati bizottság tagjai:	Dr. Geiszt Miklós, egyetemi docens, DSc. Dr. Prechl József, tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest

2014

1. BEVEZETÉS

A veleszületett immunrendszer antimikrobiális rendszerei szolúbilis és sejtes elemekből állnak. A szolúbilis komponensek közé sorolhatóak többek között bizonyos citokinek (pl. a $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\alpha/\beta$, IL-6), patogén felismerő szolúbilis receptorok (PRR) és a komplement rendszer elemei. A veleszületett immunitás sejtes elemi sejt felszínükön illetve citoplazmájukban fejezik ki a patogén felismerő receptorokat. A B1-sejtek és a makrofágok mellett az antimikrobiális válasz leghatékonyabb effektor sejtjei a granulociták. Közülük a neutrofil granulociták szabadgyök termelő képességük illetve fagocitózisuk révén leginkább a bakteriális és gomba patogének elleni védekezésben fontosak, de jelentős szerepük van az antigénprezentáció folyamatában is. Az endotélsejteket ugyan nem szokták szorosan a veleszületett immunrendszerhez kapcsolni, mégis anatómiai helyzetük, citokin termelő képességük, PRR expressziójuk, véráramlást, permeabilitást, immunsejtek transzmigrációját és számos egyéb immunológiai folyamatot szabályzó funkciójuk miatt az immunhomeosztázis nagyon hatékony és fontos fenntartói.

A komplement rendszer három ága közül a lektin út képes a mikroba- vagy megváltozott saját- felszínnek különböző szénhidrát oldalláncainak felismerésére. A lektin út PRR-eit együttesen lektin út receptoroknak (LPR) nevezzük. Az LPR-ek közé tartozik a mannóz-kötő lektin (MBL), a fikolin-1,-2,-3, valamint a CL-K1 és CL-L1 fehérjék. A receptorokhoz effektor enzimek valamint a feltételezhetően szabályzó funkciót játszó MBL-asszociált proteinek kapcsolódnak. Ezeket együttesen lektin út effektoroknak (LPE)

nevezzük. Az effektor enzimek közé tartozik az MBL-asszociált szerin-proteáz-1,-2 és -3. A MASP-1 széles szubsztrátspecifitása révén nem csak a komplementrendszer képes aktiválni, hanem a kininogén, a véralvadási rendszereket is. Emellett munkacsoportunk kimutatta, hogy a proteáz-aktiválta receptorokon keresztül hatással van az endotélsejtek működésére is.

A komplementrendszer aktivációjának egyik fontos velejárója a gyulladás kialakulása. A gyulladás során felszabaduló citokinek és a komplementrendszer opszonizáló hatása együttesen bekapcsolhatják az adaptív immunrendszert is. A gyulladás kialakulásában fontos szerepet játszanak a lipidmediátorok, a szabadgyökök, a citokinek, az akut-fázis reakció és a komplementrendszer elemei. A megfelelő immunsejtek megjelenését a gyulladásos sejtgyűlemben a citokinekhez tartozó kemokinek szabályozzák. Például az IL-8 a neutrofil granulocitákat, az MCP-1 és/vagy a makrofág kolónia stimuláló faktor (M-CSF) a monocitákat vonzzák a gyulladás helyszínére. Ezeket a citokineket a gyulladás kialakulása során az endotélsejtek is termelik, hozzájárulva a gyulladás helyének megjelöléséhez. A citokinek fontos hatása - az adhéziós molekula expresszió fokozása és a kemotaxis kiváltása mellett - az immunsejtek aktiválása is. Például gyulladásos citokinek hatására fokozódik a neutrofil granulociták fagocitózisa és granulum szekréciója.

Az endotélsejtek funkciója igen sokoldalú. Szabályozzák az érfal tónusát, biztosítják a vérben oldott tápanyagok felvételét a szövetek számára; antikoaguláns, tromboerezisztens felszint képeznek, számos vazoaktív hormont aktiválnak/inaktiválnak, illetve számos immunológiai folyamat szabályzásában részt vesznek. A

sejtdhézió egyik nevezetes megnyilvánulási formája a leukociták szelektív átjutása az endotélsejt rétegen, amely az endotélsejtek aktivációja során termelődő kemokinek (pl. IL-8), és a sejtfelszínre kerülő adhéziós molekulák (pl. E-szelektin) közreműködésével jön létre. Az endotélsejteknek anti- és proinflammatorikus mediátorok termelésén keresztül szabályozzák a gyulladás folyamatát is. Az endotélsejtek mikrobiális makromolekulákra és gyulladást kiváltó citokinekre (p. IL-1 β , TNF α) érzékenyen reagálnak: az endotélsejtek közötti jukcionális kapcsolatok meglazulnak, a sejtek kontrahálódnak, ezáltal megnő a permeabilitásuk. Ezzel párhuzamosan az endotélsejtek proinflammatorikus citokin és kemokinek termelése (pl. MCP-1, IL-6, IL-8), valamint adhéziós molekula expressziója fokozódik, ami hozzájárul a további gyulladásos folyamat fenntartásához. Ezen felül szabályzó szerepükre utal, hogy antiinflammatorikus citokinek (pl. IL-1Ra), és egyéb gyulladásgátló mediátorok termelésére is képesek. Mivel az endotélsejtek közvetlenül ki vannak téve a komplementaktivációs termékek hatásainak, ezért igen nagy mennyiségben fejeznek ki felszínükön komplement regulátor fehérjéket. Különböző, gyulladást kiváltó molekulák hatására e szabályozó fehérjék expressziója megnövekedik, így a gyulladás környezetében lévő endotélsejtek fokozottan ellenállnak a komplementrendszer sejtkárosító hatásának.

A komplement lektin útjának aktivációjában a MASP-1 kulcsszereplő, amely ezen kívül képes az endotélsejtek Ca²⁺ mobilizációját, p38-MAPK foszforilációját és az NF κ B nukleáris transzlokációját is kiváltani a sejtfelszíni proteáz aktivált receptor hasításán keresztül, azonban nem ismert, hogy ezeknek a folyamatoknak milyen élettani jelentősége van.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Először a következő kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

- Egy korábban használt preparatív eljárás módosításával javítható-e a szérum MASP-1 tisztítás hatékonysága olyan mértékben, hogy elegendő mennyiségű és minőségű fehérje álljon rendelkezésre az *in vitro* endotélsejtes vizsgálatokhoz?
- Vajon a preparálás során kapott MBL-MASP komplexek (azaz a MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAP44 és MAP19 MBL-lel alkotott komplexei) képesek-e aktiválni az endotélsejtek kalcium választ, és ha igen, milyen fehérjeszerkezeti tényezőktől függ a Ca^{2+} mobilizáció?

Ezután a következő összefüggésekre kerestük a választ:

- A MASP-1 mely jelátviteli útvonalak aktivációját váltja ki, és ezek az útvonalak hogyan vesznek részt az endotélsejtek citokintermelésében és adhézións molekula kifejeződésében?
- Miben hasonlít vagy tér el a MASP-1 és más ismert endotélsejt aktivátorok által kiváltott gyulladáson válasz mintázata?
- Képes-e a MASP-1 az endotélsejteken keresztül hatni a neutrofil granulociták kemotaxisára és adhéziónsára?

3. MÓDSZEREK

A kísérletek során használt MASP-1 fehérjék

A kísérletek során használt különböző rekombináns fehérjéket bakteriális expressziós rendszerben állítottuk elő. Az MBL-MASP komplexek tisztításakor a plazmamintákhoz nagy mennyiségű rekombináns MBL-t adtunk a Sepharose™ oszlopon történő elválasztás hatékonyságának fokozása érdekében.

HUVEC preparálás és tenyésztés

Méréseinket primer humán köldökzsínór véna endotélsejteken (HUVEC) végeztük. A kollagenázos emésztés követően az endotélsejteket 0,5% zselatinnal fedett sejtenyésztő flasksba szélesztettük. A kultúrát mikroszkópos ellenőrzés mellett konfluens állapotig tenyésztettük előzetesen optimalizált médiumban. A kísérleteket mindig a 2-4. passzálás között végeztük.

Jelátviteli útvonalak analízise

A Ca^{2+} mobilizációját Fluo-4-AM, kalcium specifikus fluoreszcens festékkel feltöltött endotélsejteken végeztük fluoreszcens mikroszkóp felhasználásával. A CREB foszforilációját fluoreszcens festékkel jelölt specifikus ellenanyag lokalizációjával detektáltuk szintén fluoreszcens mikroszkóppal. A CREB és JNK útvonalak aktivációját specifikus ellenanyagok felhasználásával Western blot módszerrel határoztuk meg.

mRNS expresszió mérése kvantitatív PCR technikával

A citokinekre és adhéziós molekulákra specifikus primereket terveztünk és LightCycler® analízist végeztünk, majd a

relatív mRNS változását mértük az aktin illetve GAPDH mRNS mennyiségéhez viszonyítva.

Citokinek termelődésének mérése

A MASP-1 hatására termelődő citokinek mennyiségét gyári ELISA módszerrel detektáltuk a kapott protokoll alapján.

Az adhézións molekulák expressziójának detektálása

Az adhézións molekulák kifejeződését specifikus ellenanyagokkal, fluoreszcens mikroszkóp segítségével detektáltuk, illetve házilag beállított sejtes ELISA méréseket végeztünk.

Neutrofil granulocita kemotaxis mérés

Megelőzően kezeltük a HUVEC sejteket rekombináns MASP-1 tartalmú médiummal, majd a rövid indukció után a médiumot pufferre cseréltük további 2,5 órára. Ezt a mintát helyeztük a Transwell™ rendszer alsó felébe, míg a perifériás vérből izolált primer neutrofil granulociták a szűrőbetét felső részébe kerültek. Inkubáció után mértük a migrált sejtek mennyiségét alkalikus foszfatáz teszttel.

Differenciáltatott PLB-985 sejtek adhéziónsja HUVEC sejtekhez

Az akut mieloid leukémiából származó PLB-985 sejtvonal DMSO jelenlétében neutrofil fenotípust vesz fel. Az így differenciáltatott neutrofil modellsejteket fluoreszcens protein festékkal jelöltük. A jelölt dPLB-985 sejteket együtt inkubáltuk a megelőzően aktivátorral kezelt HUVEC sejtekkel. Mosások után fluoreszcens lemezleolvasóval mértük az adherens sejtek mennyiségét.

4. EREDMÉNYEK

Az MBL-MASP komplexek endotélsejt aktiváló hatása

Az MBL-MASP komplexek preparálási hatékonyságát fokozta, ha a tisztítás során nagy mennyiségű rekombináns MBL-t adtunk a mintákhoz (6.1). Eredményeink szerint az MBL-MASP komplexek (azaz a MASP-1, MASP-2, MASP-3, MAp44 és MAp19 MBL-lel alkotott komplexei) közül kizárólag a MASP-1 volt képes az endotélsejtek dózisfüggő Ca^{2+} aktivációjára. A kalcium mobilizáció nem jött létre, ha az MBL-MASP preparátumokat megelőzően C1-Inhibitorral együtt inkubáltuk. Az MBL-MASP komplexek és a rekombináns MASP-1 endotélsejt aktiváló hatása dózisában és kinetikájában összemérhető volt, amely alapján igazoltuk, hogy a rekombináns MASP-1 fragmentum *in vitro* vizsgálatokban jó modellje lehet a vad típusú fehérjének.

A MASP-1 kalcium mobilizáló hatásának molekulaszervezeti vonatkozásai

Rendelkezésünkre álltak olyan mutáns MASP-1 fehérjék, amelyek 1.: inaktív szerin-proteáz doménnel rendelkeztek (S/A mutáns), 2.: konstitutív zimogén konformációjuk volt (R/Q mutáns). Ezek a mutáns fehérjék nem aktiválták az endotélsejteket, amely alapján azt mondhatjuk, hogy a Ca^{2+} szignalizáció kiváltása (6.1) a MASP-1 szerin-proteáz aktivitásának, illetve a lektin út aktiválásának (a MASP-1 zimogén formából történő aktiválása) függvénye.

A rekombináns MASP-1 hatása az endotélsejtek jelátviteli útvonalaira

Kimutattuk, hogy a rekombináns MASP-1 nem csak a kalcium mobilizációt, az NF κ B transzlokációt és a p38-MAPK aktivációt váltja ki az endotélsejtekben, hanem fokozza a CREB és JNK jelátviteli elemek foszforilációját is (6.2). A MASP-1 által kiváltott citokintermelés beindításában a p38-MAPK döntő szerepet játszik, de a korai (3 órás) aktivációban az NF κ B és JNK útvonalak is fontosak (6.2).

A MASP-1 által kiváltott citokintermelés és adhéziós molekula kifejeződés mintázata

A MASP-1 dóziszfüggő módon aktiválja az endotélsejtek IL-6 és IL-8 citokinek termelődését. A MASP-1 a citokintermelésre gyakorolt hatásán kívül szignifikánsan fokozta az endotélsejtek E-szelektin expresszióját, és csökkentette az ICAM-2 kifejeződését. A MASP-1 által kiváltott aktivációs mintázat a legtöbb elemében a trombin endotélsejtekre gyakorolt proinflammatorikus hatására hasonlít (6.2), azonban attól eltérő mintázatot is sikerült kimutattunk. Például a MASP-1 az MCP-1 expressziójára csak mRNS szinten volt hatással, míg a trombin a fehérje termelődését is fokozza. A MASP-1-nek nincs hatása az ICAM-1 kifejeződésére (sem mRNS sem fehérje szinten), ellentétben a trombinnal. A MASP-1 ilyen jellegű, egyedi hatása differenciált szabályzást biztosíthat az endotélsejteken keresztül.

A rekombináns MASP-1 által kiváltott citokintermelés és adhézíós molekula mintázat hatása a neutrofil granulociták aktivációjára

A MASP-1 által kiváltott gyulladásos mintázat felveti, hogy ennek fő célsejtjei a neutrofil granulociták lehetnek. Ezzel összhangban eredményeink azt mutatták, hogy a MASP-1 az endotélsejtek citokintermelésén keresztül képes a neutrofil granulociták kemotaxisát előidézni (6.2). Ez a hatás a pozitív kontrollként használt IL-8 hatásával megegyező intenzitású volt. Másrészt, - feltehetően az E-szelektin kifejeződésén keresztül-, a HUVEC sejtek előzetes kezelése rekombináns MASP-1-el fokozta a neutrofil granulocita modellsejtek adhézióját az endotélsejtek felszínéhez. A MASP-1 sejt-sejt adhézióra és az E-szelektin sejtfelszíni kifejeződésére gyakorolt hatásának kinetikája hasonló volt, ugyanis csak rövid távon fokozta a neutrofil granulociták adhézióját az endotélsejtekhez. A MASP-1 ebben a tekintetben a trombinra hasonlított, míg a $\text{TNF}\alpha$ -tól különbözött.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A komplement rendszer lektin útja a patogének szénhidrát oldalláncainak felismerése során aktiválódik. Ennek következményeként a zimogén MASP-1 aktivációja fokozódik. Csak az így aktiválódott MASP-1 képes az endotélsejtek aktivációjára, ami nagyon fontos szabályzó eleme a komplement rendszernek, hiszen az endotélsejtek –anatómiai helyzetük miatt-, állandó kapcsolatban vannak a komplementaktivációs termékekkel.

A MASP-1 által kiváltott citokintermelés egyedi jellegzetessége, hogy az IL-6 és IL-8 szintézis fokozása mellett nem volt hatással az MCP-1 termelés beindítására, ami arra utalhat, hogy az IL-8 szekréció specifikusan a neutrofil granulociták kemotaxisára hat, míg a monocitákat nem érinti. A MASP-1 IL-6 kifejeződésre gyakorolt hatásának élettani szerepe leginkább abban lehet, hogy e citokin szerepet játszik az akut-fázis fehérjék, köztük sok komplement komponens termelésének beindításában. Az adhézións molekulák sejt felszíni kifejeződése is leginkább arra utal, hogy a MASP-1 az endotélsejteken keresztül a neutrofil granulociták aktivációjára hat, hiszen csak az E-szelektin expresszióját fokozta, ami az egyik legfontosabb adhézións partner molekula a neutrofil-endotélsejt kapcsolatban.

Fontos megemlíteni, hogy voltak olyan faktorok, amelyek termelését fehérje szinten nem, míg mRNS szinten jelentősen befolyásolta a MASP-1. Ennek fiziológia jelentősége a MASP-1 és más aktivátorok szinergizmusában lehet, hiszen e faktorok (citokinek mikrobiális makromolekulák és saját veszélyszignálok), - melyek jellemzően a MASP-1 aktiválódásával párhuzamosan szabadulnak

fel -, így akár kisebb dózisban is jóval intenzívebben fejthetik ki hatásukat.

Összegezve tehát azt feltételezhetjük, hogy a komplement lektin út patogén felismerésének következtében aktiválódó MASP-1 nem csak a komplementrendszer elemeinek hasításában játszik szerepet, hanem az endotélsejteket is aktiválja, melynek következtében fokozódik a neutrofil granulociták kemotaxisa és adhéziója. Ez a mechanizmus tehát újabb kapcsolatot jelenthet az endotélsejteken keresztül a veleszületett immunitás legfontosabb két antibakteriális komponense, a komplement rendszer és a neutrofil granulociták között.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1 A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

- 1) Megyeri M, Jani PK, Kajdacs E, Dobo J, Schwaner E, Major B, Rigo J Jr, Zavodszky P, Thiel S, Cervenak L, Gal P, (2014) Serum MASP-1 in complex with MBL activates endothelial cells. MOLECULAR IMMUNOLOGY 59:(1) pp. 39-45.

IF: 2.645

- 2) Jani PK, Kajdacs E, Megyeri M, Dobo J, Doleschall Z, Futosi K, Timar CI, Mocsai A, Mako V, Gal P, Cervenak L, (2014) MASP-1 Induces a Unique Cytokine Pattern in Endothelial Cells: A Novel Link between Complement System and Neutrophil Granulocytes. PLOS ONE 9:(1) p. e87104.

IF: 3.730

A disszertációhoz kapcsolódó publikációkra vonatkozó
összesített impakt faktor: **6,375**

6.2 A disszertációtól független publikációk

- 1) Jani Péter Károly, Makó Veronika, Cervenak László, (2011) Természetes és szintetikus flavonoidok gyulladásgátló hatásának összehasonlítása in vitro endotélsejt modellen. ÉRBETEGSÉGEK XVIII.:(4.) pp. 89-95.
- 2) Kajdácsi E, Jani PK, Csuka D, Varga LA, Prohászka Z, Farkas H, Cervenak L (2014) Endothelial cell activation during edematous attacks of hereditary angioedema types I and II. J ALLERGY CLIN IMMUNOL. 133(6):1686
IF: 12.047
- 3) Csuka D, Simon D, Hóbor R, Uray K, Prohászka Z, Bánlaki Z, Jani PK, Szilágyi A, Hudecz F, Rajczy K, Beke G, Boros Major A, Tordai A, Illés Z, Berki T, Czirják L, Füst G, (2013) Serum concentration of IgG type antibodies against the whole EBNA-1 and its aa35-58 or aa398-404 fragments in the sera of patients with systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY 171:(3) pp. 255-262.
IF: 3.409

A disszertáció témájától független publikációkra vonatkozó összesített impakt faktor: **15,456**